

# PRODUCTION POLYPEPTIDE BY CELL-FREE POLYPEPTIDE SYNTHESIS SYSTEM

**Publication number:** JP4200390 (A)

**Publication date:** 1992-07-21

**Inventor(s):** YOKOYAMA SHIGEYUKI; ENDOU YAETA; KIKAWA TAKANORI +

**Applicant(s):** YOKOYAMA SHIGEYUKI +

**Classification:**

- international: C12P21/00; C12P21/00; (IPC1-7): C12P21/00

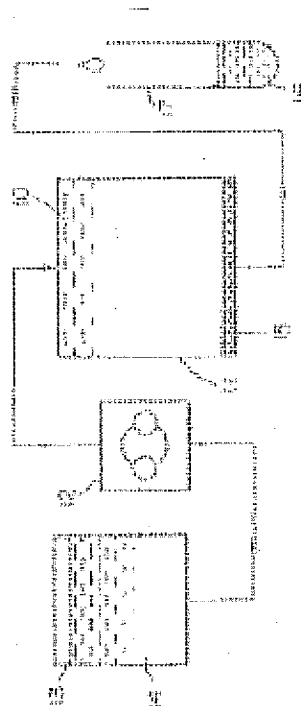
- European:

**Application number:** JP19900334103 19901130

**Priority number(s):** JP19900334103 19901130

## Abstract of JP 4200390 (A)

**PURPOSE:** To improve the stability and reproducibility of the subject production process by carrying out the synthesis while minimizing the volume of gaseous phase in a specific reactor. **CONSTITUTION:** A cell-free polypeptide synthesis system 10 containing the main body such as liposome and tRNA and a substrate such as amino acid and ATP is charged into a reactor 11 in a state free from gaseous phase. A substrate solution 14 stored at  $\leq 10$  deg.C in a substrate solution tank 13 is continuously supplied to the upper part of the reactor 11 with a pump 12 for high- performance liquid chromatography, etc., while preventing the intrusion of gaseous phase into the system. The reaction chamber is maintained at 20-40 deg.C to effect the synthetic reaction of a polypeptide. The liquid 16 containing the reaction product is continuously taken out of the system through an ultrafilter 15 placed under the tank 11 to collect the objective polypeptide of a cell-free polypeptide synthesis system in the collection vessel such as fraction collector tube 17.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-200390

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月21日

C 12 P 21/00

A  
C8214-4B  
8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑭ 発明の名称 無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法

⑮ 特 願 平2-334103

⑯ 出 願 平2(1990)11月30日

特許法第30条第1項適用 平成2年7月25日、社団法人日本生化学会発行の「生化学 Vol. 62, No. 7, 1990」に発表

⑰ 発 明 者 横 山 茂 之 東京都文京区向丘1丁目20番16号  
 ⑰ 発 明 者 遠 藤 弥 重 太 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東472-304  
 ⑰ 発 明 者 木 川 隆 則 東京都台東区上野桜木町1-5-2  
 ⑱ 出 願 人 横 山 茂 之 東京都文京区向丘1丁目20番16号  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 志賀 正武 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 無細胞ポリペプチド合成系が収容された反応槽に基質溶液を供給しつつ、該反応槽内でポリペプチド合成反応を生じさせ、該反応槽から反応生産物を取り出してポリペプチドを連続的に製造する方法において、

上記反応槽内の気相の存在を最小限に制御しつつ合成反応を生じさせることを特徴とする無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

(2) 上記基質溶液を、流路に気相を介在させずに液体を圧送するポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の下側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合

成系によるポリペプチドの製造方法。

(3) 上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の上側に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

(4) 上記基質溶液を、上記ポンプで反応槽内に連続的に圧送し、反応槽内の側方に設けられた限外ろ過器を通して反応生産物を含む液を取り出すことを特徴とする請求項1に記載の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 「産業上の利用分野」

本発明は、無細胞ポリペプチド合成系によりポリペプチドを製造する方法に係わり、より詳細には反応系に連続的に基質(ATP, GTP, アミノ酸等)を供給し、生成ポリペプチドおよびAMP, GDP, ピロリン酸塩、無機リン酸等のポリペプチド合成生産物を系から取り出すことを特徴とするポリペプチドの製造方法に関する。

GTP、CTP、UTP等の基質とを含み、これらを含む溶液を、気相を含まない状態で反応槽1内に収容したものが使用される。

上記合成系の本体は、合成系を20～40℃の適宜な温度に保つことにより、アミノ酸、ATP、GTP、CTP、UTP等を基質およびエネルギーとし、mRNAもしくはDNAの情報を元に、ポリペプチドを合成する。

合成されるポリペプチドとしては、各種の酵素やホルモンなどのタンパク質等が合成可能である。合成されるポリペプチドの種類は、合成系本体の情報によって決定される。

第1図は、本発明によるポリペプチドの製造方法の第1の例を説明するための図である。この例では、無細胞ポリペプチド合成系10を気相を含まない状態で反応槽11に収容し、系内に気相を介することなく液体を圧送するポンプ12によって基質溶液タンク13内の基質溶液14を反応槽11の上側から連続的に圧送し、反応槽11内でポリペプチド合成反応を生じさせ、反応槽11の

系本体を透過させることなく、合成されたポリペプチド、基質あるいはその分解物(AMP、GMP、ポリリン酸塩、無機リン酸塩など)を透過させるような孔径を有するろ過材を備えたものが使用される。

上記基質溶液タンク13内の基質溶液14は、10℃以下の温度で保存するのが望ましく、また反応槽11内は20～40℃に保温するのが望ましい。

この例によるポリペプチドの製造方法では、基質溶液14を、流路に気相を介在させずに液体を圧送するポンプ12で反応槽11内に連続的に圧送し、反応槽11内の下側に設けられた限外ろ過器15を通して反応生産物を含む液16を取り出し、系内に気体部分を含まずに反応生産物を連続的に生産することにより、反応槽11内の圧力制御や基質溶液14の送液を安定して行うことができる。

また、このことから反応槽11内の圧力を高くすることが可能となり、反応槽11内での気泡の

下側に設けられた限外ろ過器15を通して反応槽11内の反応生産物を含む液16を系外に取り出し、反応生産物を連続的に生産する。系外に取り出された反応生産物を含む液は、フラクションコレクターチューブ17などの採取容器に採取する。なお反応槽11内はマグネチックスターラーなどを用い攪拌状態としても良い。

上記ポンプ12は、系内に気相を介することなく、脈流が少なく、圧力、流量の制御が可能なものが使用され、プランジャーポンプ、ローラーチューブポンプ、ダイヤフラムポンプ、ペローズポンプ、ロータリーポンプなどが使用され、より具体的には、高速液体クロマトグラフィー用ポンプ、中圧液体クロマトグラフィー用ポンプ、低圧液体クロマトグラフィー用ポンプが好適に使用される。

このポンプ12による基質溶液の圧送量は、通常は一定に設定されるが、反応時間の経過とともに圧送量を増加させあるいは減少させても良い。

上記限外ろ過器15は、反応槽11内に収容されたりボゾームやRNAあるいはDNA等の合成

発生を抑えることが可能となる。従って気相と液相との界面で生じるタンパク質の変性を防ぐことができる。

これらのことからこの製造方法では、無細胞ポリペプチド合成系においてポリペプチドを合成する際の再現性を大巾に向上させることができる。

第2図は、本発明によるポリペプチドの製造方法の第2の例を説明するための図である。この例では、上側に限外ろ過器15を設け、下側に基質溶液の供給口19を設けた反応槽18を用い、この反応槽18内に無細胞ポリペプチド合成系を収納し、ポンプ12により圧送される基質溶液14を供給口19から導入し、上側の限外ろ過器15を通して反応生産物を含む液16を系外に取り出し、反応生産物を連続的に製造する方法である。

この第2の例では、反応槽18の下側から基質溶液14を供給し、上側に限外ろ過器15を設けて反応液を取り出すようにしたので、万一反応槽18内に気泡が生じても、気泡が直ちに上側の限外ろ過器15を通過して系外に排出されるので、送

2) 37℃で30分間インキュベーションする。

3) 水冷して反応を止め、1 mlの酢酸エチル(0.1 ~ 1 mg/mlのクロラムフェニコールを含む)を加え、数秒攪拌する。

4) 静置した後、下層(水層)200  $\mu$ lを取り除く。酢酸エチルを窒素ガスで蒸発させ、再び20  $\mu$ lの酢酸エチルを加えて再溶解し、ワットマンLK6DF TLCプレートにスポットする。

5) クロロホルム:メタノール(94:6)で平衡化したタンク内で展開する。展開後プレートを乾燥させ、Hyperfilm- $\beta$ maxなどのフィルムを用いオートラジオグラフィーを行う。CAT活性によるが通常16時間以上露出させる。

このCAT活性測定法により反応液中のCAT活性を測定しその結果を第4図に示した。第4図において1番左のレーン[S]は供給する基質溶液の、1つにおいてそれぞれ5時間後[5]、8時間後[8]、11時間後[11]、14時間後[14]、17時間後[17]の流出液のCATアッセイである。CATの合成は各時間で安定して行なわれており、

HPLCポンプによる基質溶液の供給によって、長時間安定してタンパク合成を継続させることができた。しかも17時間反応した後の反応液(R)にもCATは同様に存在し、17時間反応後の反応液は依然として十分なタンパク質合成能力を持っていることが分かり、さらに長時間反応することが可能であると考えられる。

このようにして合成したCATを含む流出液からCATのアフィニティークロマトグラフィーによりCATを精製した。この精製したCATを、1.4 ~ 6.6万ダルトンの分子量マーカーとともにSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析し、クマジーブリリアントブルーで染色した。その結果を第5図に示した。CAT(分子量2.5万ダルトンの三量体)に相当する位置に単一のバンドが見られ、クマジーブリリアントブルーC-250で十分に染色できる量のCATを、無細胞ポリペプチド合成系から得ることができた。この結果からCATの合成量は0.1 mg程度と見積もることができた。

#### 「発明の効果」

以上説明したように、本発明によるポリペプチドの製造方法では、無細胞ポリペプチド合成系内に気体部分を存在させずに基質溶液を連続的に圧送しつつ、反応生成物を系外に取り出してポリペプチドを連続的に生産することにより、反応槽内の圧力制御や基質溶液の送液を安定して行うことができる。

また、このことから反応槽内の圧力を高くすることが可能となり、反応槽内での気泡の発生を抑えることが可能となる。従って気相と液相との界面で生じるタンパク質の変性を防ぐことができる。

これらのことから、無細胞ポリペプチド合成系においてポリペプチドを合成する際の再現性を大巾に向上させることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の無細胞ポリペプチド合成系によるポリペプチドの製造方法の第1の例を説明するための概略構成図、第2図は、同ポリペプチドの製造方法の第2の例を説明するための概略構

成図、第3図は、同ポリペプチドの製造方法の第3の例を説明するための概略構成図、第4図は、実施例の結果を示す図でCAT活性測定結果を示す図、第5図は同実施例で製造したCATの電気泳動結果を示す図である。

第6図は、従来の無細胞翻訳系によるポリペプチドの製造方法を説明するための概略構成図である。

- 10 ... 無細胞ポリペプチド合成系
- 11, 18 ... 反応槽
- 12 ... ポンプ
- 13 ... 基質溶液タンク
- 14 ... 基質溶液
- 15 ... 限外ろ過器
- 16 ... 反応生成物を含む液

出願人 横山茂之

第6図

